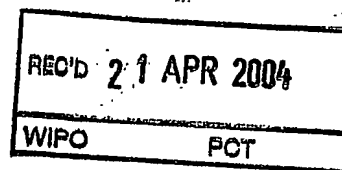


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

(17. 03. 2004)

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 13 971.0
Anmeldetag: 27. März 2003
Anmelder/Inhaber: Degussa AG,
40474 Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Gekoppeltes cofaktorabhängiges enzymatisches
Reaktionssystem
IPC: C 12 P 1/00

BEST AVAILABLE COPY

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

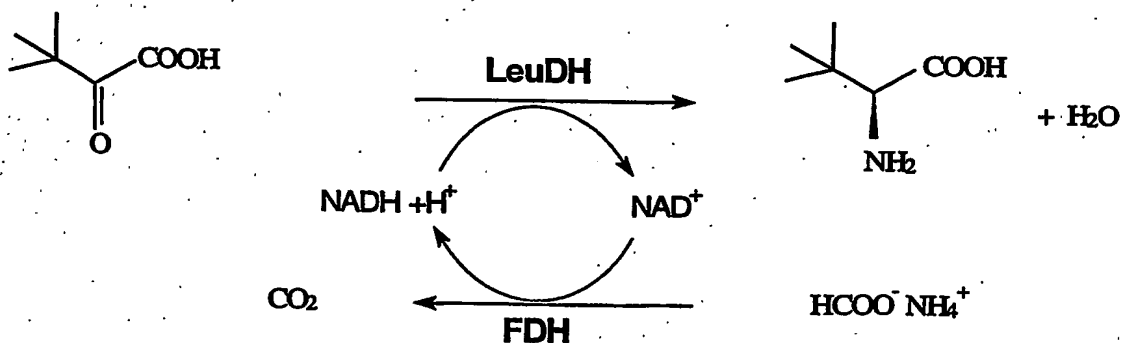
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Gekoppeltes cofaktorabhängiges enzymatisches Reaktionssystem

Die vorliegende Erfindung betrifft ein gekoppeltes enzymatisch arbeitendes Reaktionssystem zur Reduktion von Carbonylverbindungen, welches sich dadurch auszeichnet, dass es in einer Emulsion durchgeführt wird. Insbesondere richtet sich die Erfindung auf ein Reaktionssystem umfassend eine cofaktorabhängige enzymatische Transformation einer organischen Verbindung, vorzugsweise der Reduktion einer Carbonylverbindung, wobei der Cofaktor im selben System enzymatisch regeneriert wird.

Die Gewinnung optisch aktiver organischer Verbindungen, z.B. Alkohole und Aminosäuren, auf biokatalytischem Wege gewinnt zunehmend an Bedeutung. Als ein Weg zur großtechnischen Synthese dieser Verbindungen hat sich der gekoppelte Einsatz zweier Dehydrogenasen unter Cofaktorregenerierung gezeigt (DE19753350).

Schema 1:



In situ Regeneration von NADH mit der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase bei der reduktiven Aminierung von Trimethylpyruvat zu L-tert-Leucin (Bommarius et al. Tetrahedron Asymmetry 1995, 6, 2851-2888).

Die im wässrigen Medium effizient eingesetzten Biokatalysatoren weisen neben ihrer katalytischen Eigenschaft und Effizienz zudem den Vorteil auf, dass im

Gegensatz zu einer Vielzahl an synthetischen metallhaltigen Katalysatoren auf den Einsatz metallhaltiger, insbesondere schwermetallhaltiger und somit toxischer Einsatzstoffe verzichtet werden kann. Auch kann auf den Einsatz von teuren und zudem gefährlichen Reduktionsmittel wie beispielsweise Boran bei der asymmetrischen Reduktion verzichtet werden.

Allerdings treten Schwierigkeiten bei der Umsetzung von Substraten auf, die schlecht wasserlöslich sind.

Insbesondere betrifft dies die Herstellung von Alkoholen aus hydrophoben Carbonylverbindungen, bei denen die Substratlöslichkeit oftmals unter 10 mM liegt. Ähnliche Schwierigkeiten liegen bei schlecht wasserlöslichen

Produkten vor. Eine prinzipiell denkbare Lösung wäre die

Durchführung der biokatalytischen Reduktion in einem polaren organischen Solvens bzw. einer resultierenden, homogenen wässrigen Lösung daraus. Hierbei sollten sowohl Enzyme als auch Substrat und ggf. Produkt löslich sein. Ein genereller Nachteil einer direkten Gegenwart eines

organischen Solvens stellt allerdings die im Allgemeinen auftretende erhebliche Verminderung der Enzymaktivität unter diesen Bedingungen dar (siehe z.B. Anderson et al., *Biotechnol. Bioeng.* 1998, 57, 79-86). Insbesondere die FDH als einzige bislang im technischen Maßstab eingesetzte und in kommerziellen Mengen zugängliche Formiatdehydrogenase weist bedauerlicherweise eine hohe Empfindlichkeit

gegenüber organischen Solventien auf. Dieses zeigt sich auch in den Vergleichsbeispielen 1 unter Verwendung von DMSO, Sulfolan, MTBE, Aceton, Isopropanol und Ethanol als organischer Solvenskomponente bei Zusatzmengen von je 10% (siehe Fig. 1).

Zur Lösung dieses Problems betreffend einer Stabilisierung der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidini* in Gegenwart organischer Solventien sind verschiedene Ansätze bekannt, z.B. die Durchführung von Reaktionen durch zusätzlichen

Einsatz von Tensiden als oberflächenaktive Stoffe. Nachteilig zeigt sich dabei aber die etwa um den Faktor 40 (!) verminderte Reaktionsgeschwindigkeit sowie die aufgetretene Inhibierung der Formiatdehydrogenase (B. Orlich et al., *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 65, 357-362.). Die Autoren bemerken zudem, dass aufgrund der niedrigen Stabilität der eingesetzten Alkoholdehydrogenase ein Reduktionsprozeß unter diesen Bedingungen einer Mikroemulsion nicht ökonomisch ist. Zudem besteht ein weiteres Problem in der Aufarbeitung, bei der das resultierende Produkt von dem Tensid getrennt werden muss, was sich oftmals als nicht trivial erwiesen hat.

Eine prinzipielle Möglichkeit besteht auch in der Durchführung von enzymatischen Reaktionen bzw. Oxidationen in einem Zweiphasensystem. Allerdings gilt hier - analog obig beschriebenen destabilisierenden Effekten bei der Anwesenheit organischer, wasserlöslicher Solventien - dass nur eine bestimmte Klasse von organischen Solventien, nämlich solche mit sehr hydrophobem Charakter, wie beispielsweise Heptan und Hexan, als geeignet erwiesen haben. Dagegen zeigten Stabilitätsversuche mit anderen unpolaren Solventien wie Toluol, aber vor allem mit typischen Lösungsmitteln wie MTBE und Ethylacetat eine drastische Aktivitätsabnahme der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* selbst in kürzester Standzeit (H. Gröger et al., *Org. Lett.* 2003, 5, 173-176). In Anwesenheit von Heptan und Hexan dagegen ist die Reaktion zwar durchführbar, allerdings ist die Löslichkeit der Ketonsubstrate in diesen Solventien oftmals begrenzt.

Eine weitere prinzipielle Möglichkeit der Durchführung von biokatalytischen Reaktionen besteht in der Anwendung immobilisierter Enzyme im organischen Solvens oder die Verwendung von Enzymen in einer homogener Lösung, bestehend aus Wasser und einem wassermischbaren organischen Solvens. Allerdings sind diese Techniken bei der es zu einem

direkten Kontakt von organischen Solvens und Enzym kommt auf wenige Enzymklassen, insbesondere Hydrolasen begrenzt. So wird in DE4436149 bemerkt, dass die „direkte Gegenwart von organischen Lösungsmitteln (wassermischbar oder nicht wassermischbar) nur von wenigen Enzymen vertragen wird, die zur Klasse der Hydrolasen gehören.“ Wenige weitere Beispiele aus anderen Enzymklassen sind zwar in der Zwischenzeit bekannt (so u.a. Oxynitrilasen), die in DE4436149 gemachte Feststellung besitzt aber für die Mehrzahl der Enzyme nach wie vor Gültigkeit. So ist eine effiziente Immobilisierung der FDH aus *Candida boidini* nicht bekannt. Vielmehr ist beispielsweise mit der Eupergitmethode als ein Standardwerkzeug der industriellen Immobilisierung bekannt, dass die Restaktivität dieser FDH nach Immobilisierung bei <20% liegt, was für eine technische Nutzung zu wenig ist. Zudem ist die Immobilisierung selbst mit zusätzlichen Kosten durch den Immobilisierungsschritt sowie die Immobilisierungsmaterialien verbunden.

Technisch wurden deshalb Verfahren entwickelt, die die Gegenwart organischer Lösungsmittel aufgrund der Gefahr der Deaktivierung bzw. Denaturierung der Enzyme vermeiden. So beschreibt DE4436149 ein Verfahren, bei dem das Produkt aus der Reaktionslösung durch eine produktdurchlässige, insbesondere hydrophobe Membran in ein organisches Lösungsmittel extrahiert wird. Verglichen mit einem Standardverfahren in einem Rührkesselreaktor ist dieses Verfahren allerdings technisch deutlich aufwendiger, zudem sind auch die benötigten organischen Membranen ein zusätzlicher Kostenfaktor. Darüber hinaus ist diese Methode nur für kontinuierliche Prozesse geeignet. Zudem kann der prinzipielle Nachteil der Durchführung der Reaktion bei niedrigen Substratkonzentrationen auch bei dieser Methode nicht vermieden werden. Demzufolge liegen die Substratkonzentrationen unterhalb der Löslichkeitsgrenze, die bei den meisten Ketonen bei 10 mM oder erheblich

darunter liegt. Für eine technische Umsetzung wären aber Substratkonzentrationen von 100 mM oder darüber wünschenswert.

5 Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass somit kein Verfahren bekannt ist, welches die oben aufgeführten Nachteile umgehen hilft.

10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, eine Möglichkeit anzugeben, wie insbesondere schlecht wasserlösliche organische Verbindungen einer gekoppelten cofaktorabhängigen enzymatischen Umsetzung in derart ausreichendem Maße zugänglich gemacht werden können, dass eine Anwendung der Möglichkeit im technischen Maßstab unter insbesondere ökonomisch und ökologisch vorteilhaften Voraussetzungen erfolgen kann.

15 Diese Aufgabe wird anspruchsgemäß gelöst. Ansprüche 1 bis 10 richten sich auf ein erfindungsgemäß operierendes Reaktionssystem. Ansprüche 11 und 12 schützen ein erfindungsgemäßes Verfahren und Ansprüche 13 und 14 die vorteilhafte Verwendung des Reaktionssystems.

20 Dadurch, dass man ein gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem aufweisend eine cofaktorabhängige enzymatische Transformation einer organischen Verbindung und eine enzymatische Regeneration des Cofaktors in einem rein wässrigen Lösungsmittelsystem ohne Tensidzusatz
25 bereitstellt, wobei das Substrat in einer Menge von mindestens 50 mM pro Liter Wasser in die enzymatische Transformation eingesetzt wird, sofern die Löslichkeitsgrenze des Substrats nicht unterschritten wird, gelangt man insbesondere überraschend, keinesfalls
30 vorhersehbar und erfindungsgemäß besonders vorteilhaft zur Lösung der gestellten Aufgabe. Entgegen der aus dem Stand der Technik ableitbaren Meinung, insbesondere angesichts der befürchteten dramatischen Aktivitätsabnahmen der Enzyme und hier besonders der der Formiatdehydrogenase aus *Candida*

boidinii in Gegenwart organischer Komponenten mit einem logP-Wert von <3.5 (unter die auch die meisten der Substrate bzw. Produkte fallen), ist es überraschenderweise möglich, trotz direkter Anwesenheit solcher organischer Komponenten (Substrate/Produkte), das gekoppelte enzymatische Reaktionssystem ohne signifikanten Aktivitätsverlust (eines) der Enzyme arbeiten zu lassen. Das Vergleichsbeispiel 2 unterstreicht diesen überraschenden Effekt; gemäß dieser in Vergleichsbeispiel 2 beobachteten drastischen Aktivitätsabnahme mit nahezu vollständigem Aktivitätsverlust der FDH innerhalb nur weniger Stunden wäre zu erwarten gewesen, dass sich unter den erfindungsgemäßen Reaktionsbedingungen keine signifikanten Umsätze ergeben.

Es ist also vorteilhaft, dass man im Reaktionssystem zumindest anfänglich eine Emulsion oder eine Suspension vorliegen hat. Besonders bevorzugt liegt die eingesetzte Substratmenge bei 50 bis 1500 mM, ganz bevorzugt bei 100 bis 1000 mM, und äußerst bevorzugt bei 100 bis 500 mM, pro Liter Wasser, sofern die Löslichkeitsgrenze der Substrate nicht unterschritten wird.

Bei der cofaktorabhängigen Transformation handelt es sich vorteilhafterweise um die Reaktion einer Oxidoreductase. Als Substrat für diese Art der Umwandlung können vorteilhafterweise Carbonylverbindungen dienen, insbesondere Aldehyde oder unsymmetrische Ketone. Diese werden in vorteilhafter Art und Weise zu enantiomerenangereicherten Alkoholen reduziert.

Es ist jedoch auch möglich, als Substrat eine Alkoholverbindung einzusetzen, insbesondere einen primären oder einen chiralen sekundären Alkohol, der dann entsprechend oxidiert wird. Die Art der Umsetzungen sind vielfältig und beinhalten jegliche Arten von Redoxreaktionen. Besonders geeignet ist das vorliegende Reaktionssystem zur Reduktion von Carbonylverbindungen

unter Bildung von enantiomerenangereicherten Alkoholen. Dabei ist sowohl die Reduktion von Aldehyden unter Ausbildung von primären Alkoholen (siehe dazu auch Beispiel 7), als auch die asymmetrische Reduktion von
5 unsymmetrischen Ketonen von besonderer Bedeutung (siehe dazu Beispiele 3 bis 6).

Das Reaktionssystem kann mit jedweder cofaktorabhängigen Oxidoreductase betrieben werden, wobei der Cofaktor durch die Oxidoreduktase verbraucht wird und durch ein zweites
10 enzymatisches System regeneriert werden kann, es sich also um ein gekoppeltes enzymatisches System handelt. Weitere geeignete Enzyme dieser Art können der Literatur entnommen werden (Enzyme Catalysis in Organic Synthesis; Ed.: K. Drauz, H. Waldmann, Vol. I und II, VCH, 1995).

15 Als bevorzugt einzusetzendes Enzym hat sich eine Alkoholdehydrogenase oder Aminosäuredehydrogenase erwiesen.

Die Art der Regeneration des Cofaktors richtet sich primär nach dem eingesetzten Cofaktor selbst. Aus oben angegebener Literatur sind verschiedene Methoden der

20 Cofaktorregenerierung zu entnehmen. Der Fachmann ist unter den gegebenen Randbedingungen von Lösungsmittel, Enzymen, Raumzeitausbeute frei in der Wahl des Regenerationsmediums.

Im Allgemeinen eignet sich im Hinblick auf NAD⁺ als Cofaktor (bei Oxidationsreaktionen) eine NADH-Oxidase aus
25 z.B. *Lactobacillus brevis* oder *L. kefir* (DE10140088).

Weiterhin hat sich bei Reduktionsreaktionen auch die Regeneration des Cofaktors NADH durch eine Formiatdehydrogenase als sehr erfolgreich erwiesen.

Insbesondere vorteilhaft ist der Einsatz der

30 Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* in diesem Zusammenhang.

Als Cofaktoren werden vorzugsweise die am gebräuchlichsten und unter den Reaktionsbedingungen am ökonomischsten arbeitenden Cofaktoren herangezogen. Insbesondere sind dies
35 die Cofaktor NADH oder NADPH.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist ebenfalls ein Verfahren zur enzymatischen Transformation einer organischen Verbindung unter Anwendung des erfindungsgemäßen Reaktionssystem. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Verfahren um die Herstellung einer enantiomer angereicherten organischen Verbindungen, vorzugsweise einem primären bzw. einem chiralen sekundären Alkohol.

Die Ausgestaltung des Verfahrens kann anhand des beschriebenen Reaktionssystems und den nachfolgend dargelegten Beispielen nach dem Belieben des Fachmanns ausgeführt werden. Es werden unter den gegebenen Randbedingungen die sonst für die enzymatische Umsetzung bekannten Bedingungen entsprechend eingestellt.

So kann die Reaktion vorzugsweise bei Temperaturen von 10 bis 80°C, bevorzugt von 20 bis 60°C, und ganz bevorzugt von 20 bis 40°C durchgeführt werden. Der Fachmann wird sich bei der Einstellung der Temperatur an Randbedingungen wie z.B. Schnelligkeit der Umsetzung, Ausbeute, Enzymstabilität und Nebenproduktspektrum orientieren.

Nach vollendeter Reaktion kann die jetzt homogene oder heterogene Reaktionsmischung vorteilhafterweise in der Art behandelt werden, dass man das Reaktionsgemisch, gegebenenfalls durch Zusatz eines organischen Solvens, in eine wässrige und eine organische Phase auftrennt, und aus der organischen Phase das gewünschte Produkt isoliert.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls eine Vorrichtung zur Transformation von organischen Verbindungen aufweisend ein erfindungsgemäßes Reaktionssystem.

Vorteilhaft einzusetzende Vorrichtungen sind beispielsweise der Rührkessel oder Rührkesselkaskaden.

Ebenfalls ein Aspekt der Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Reaktionssystems zur enzymatischen Transformation organischer Verbindungen oder zur Diagnose bzw. Analyse. Vorzugsweise erfolgt die enzymatische

Transformation einer organischen Verbindung dabei unter Ausbildung von enantiomer angereicherten Produkten.

Unter gekoppeltem enzymatischen System wird erfindungsgemäß verstanden, dass eine enzymatische Transformation einer organischen Verbindung unter Verbrauch eines Cofaktors abläuft und der Cofaktor in situ durch ein zweites enzymatisches System regeneriert wird. Im Ergebnis führt dies zu einer Verminderung des Einsatzes teurer Cofaktoren, da diese - bezogen auf den Gesamtumsatz nur in katalytischen Mengen eingesetzt werden müssen.

Es ist dabei besonders überraschend, dass trotz der gängigen Lehrmeinung die beiden eingesetzten Enzyme nicht durch die Anwesenheit der Emulsion beeinträchtigt werden und es so gelingt, in sehr guten Raumzeitausbeuten die gewünschten Produkte herzustellen.

Wie sich gezeigt hat, können für sowohl Aldehyde als auch Ketone - im Gegensatz zu den meisten organischen Solventien (siehe Vergleichsbeispiele), die zu einer schnellen Desaktivierung der eingesetzten FDH führen - selbst bei hohen Substratkonzentrationen hervorragende Stabilitätseigenschaften der Enzyme, insbesondere der sehr instabilen Formiatdehydrogenase, auch nach mehreren Tagen noch beobachtet werden. Zudem ist auch der schnelle Reaktionsverlauf, der in ähnlicher Geschwindigkeit erfolgt wie bei niedrigsten Ketonkonzentrationen in rein-wässriger Lösung (also unter theoretisch optimalsten Bedingungen) sehr überraschend. Diese schnelle Bildungsrate unter Prozessbedingungen konnte in keinsten Weise erwartet werden, nicht zuletzt auch angesichts der erheblichen Aktivitätsminderungen beim Zusatz von Ketonsubstraten in kleinen Mengen von <15 mM (siehe Vergleichsbeispiel 2). Vielmehr wäre aufgrund dieser erheblichen Aktivitätseinbußen selbst in Gegenwart kleiner Ketonmengen zu erwarten gewesen, dass bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration kein bzw. nur ein geringer Umsatz

erfolgt. Im Gegensatz zu dieser Erwartung verläuft überraschenderweise die gewünschten Reaktionen unter Prozessbedingungen nicht nur äußerst schnell, sondern führt überraschenderweise auch zu einem vollständigen Umsatz.

5 Die Ergebnisse mit neuen und erfindungsgemäßen Reaktionssystem finden sich im experimentellen Teil wieder. Die Vergleichsbeispiele mit anderen organischen Solventien sind in Fig. 1 aufgeführt.

10 Das Verfahren gelingt sowohl mit dem Wildtyp der Formiatdehydrogenase aus *Candida Boidini* aber auch mit einer gentechnisch veränderten Form dieses Enzyms (DE19753350). Als Cofaktor kommt wie gesagt vorzugsweise NADH zum Einsatz. Für die experimentellen Versuche kann beispielsweise eine ADH aus *Rhodococcus*, vorzugsweise
15 *Rhodococcus erythropolis*, als ADH-Komponente zum Einsatz kommen.

Generell können die eingesetzten Enzyme in zellfreier beliebig aufgereinigter nativer oder rekombinant hergestellter Form zur Reaktion eingesetzt werden.
20 Vorzugsweise werden dabei auch Rohextrakte eingesetzt.

Ein Hauptvorteil dieses Verfahrens besteht in der Einfachheit des Prozesses. So sind keine aufwendigen Verfahrensschritte enthalten, und das Verfahren kann in den bevorzugten Batchreaktoren durchgeführt werden. Ebenso
25 werden im Gegensatz zu früheren Verfahren keine speziellen Membranen, die das wässrige Medium vom organischen Medium trennen, benötigt. Auch die in einigen bisherigen Prozessen benötigten Tensid-Zusätze entfallen bei diesem Verfahren. Dies war so aus dem Stand der Technik nicht zu entnehmen
30 und macht dennoch das gegenständliche Verfahren überaus vorteilhaft.

Darüber hinaus ist das weitere Downstream-Processing äußerst einfach. Eine einfache Extraktion mit einem nicht-

wasserlöslichen organischen Solvens führt zu einer einfachen Isolierungsmethode des entstandenen Produkts. Der mögliche, quantitative Umsatz ermöglicht zudem - nach Verdampfen des organischen Extraktionsmittels im Vakuum - das Vorliegen eines bereits hochreinen Rohprodukts. Eine aufwendige Reinigung des Produkts von einem (eventuell ebenfalls) hochsiedenden Substrat entfällt demzufolge.

Enantiomerenangereichert oder enantiomer angereichert bezeichnet die Tatsache, daß eine optische Antipode im Gemisch mit ihrer anderen zu >50% vorhanden ist.

Die dargestellten Strukturen beziehen sich auf alle möglichen Diastereomere und bezüglich eines Diastereomers auf die darunter fallenden möglichen zwei Enantiomere der in Frage stehenden Verbindung.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die nachfolgend beschriebenen Beispiele verdeutlicht.

Experimenteller Teil:**Beispiel 1 (Vergleichsbeispiele der FDH-Aktivitäten)**

Es werden 2,72 g (0,8 mol/L) Natriumformiat und 1,14 g (0,1 mol/L) Di-Kalium-Hydrogen-Phosphat-Tri-Hydrat eingewogen und in 40 mL VE-H₂O gelöst. Mit Ammoniak-Lösung (25%) und Ameisensäure (100%), bzw. entsprechenden Verdünnungen, wird der pH-Wert der Lösung auf 8,2 gestellt. Dann wird die Lösung in einen 50 mL-Meßkolben überführt und mit VE-H₂O aufgefüllt. Separat dazu werden 71,7 mg (4 mmol/L) NAD⁺-Tri-Hydrat abgewogen und in ca. 20 mL VE-H₂O gelöst. Mit Ammoniak-Lösung (25%) und Ameisensäure (100%), bzw. entsprechenden Verdünnungen, wird der pH-Wert der Lösung auf 8,2 gestellt. Dann wird die Lösung in einen 25 mL-Meßkolben überführt und mit VE-H₂O aufgefüllt. Anschließend werden jeweils 500 µL der Substratlösung sowie der NADH-Lösung in der zur Messung verwendeten 1 cm-Küvette gemischt. Nach Zugabe von 10 µL der Enzymlösung, wobei als Lösungsmittel eine 10%-ige Lösung eines organischen Solvens (siehe Tabelle) in Wasser zum Einsatz kommt, wird kurz geschüttelt, die Küvette ins Photometer gestellt und die Datenaufnahme gestartet. Die Enzymlösung wird erst direkt vor Meßbeginn zugegeben. Die Aktivitäten der Enzyme werden nach bestimmten Zeitabschnitten durch den photometrischen Nachweis der Reaktion NAD⁺ zu NADH bestimmt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Temperatur von 30° C, einer Wellenlänge von 340 nm und mit einer Meßzeit von 15 min. Die Ergebnisse sind anbei in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 1. Enzymaktivität der FDH in U/mL in Abhängigkeit von Solvens und Zeit

Zeit	Butanol	MEK	DMSO	THF	Sulfolan	Acetonitril
[d]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]
0,000	0,5262	0,0058	0,7965	0,8492	0,0028	0,7961
0,042	0,0006	0,0011	0,7880	0,4357	0,0003	0,4494
0,125			0,7794	0,0414		0,0840
1,097			0,2669			0,0008
2,035			0,2331			
2,896			0,2201			
5,927			0,1763			
7,885			0,1404			
9,948			0,1205			
13,073			0,0915			
14,892			0,0717			
16,875			0,0540			
19,938			0,0355			

Tab. 2. Enzymaktivität der FDH in U/mL in Abhängigkeit von Solvens und Zeit

Zeit	Aceton	Ethanol
[d]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]
0,000	0,8355	0,8491
0,042	0,7402	0,7689
0,750	0,5893	0,6367
1,000	0,5426	0,5933
1,875	0,3484	0,4687
2,760	0,2691	0,3510
3,781	0,2004	0,2814
4,646	0,1614	0,2240
5,875	0,1325	0,1736
6,778	0,0987	0,1486
7,792	0,0794	0,1277
8,729	0,0610	0,0998
11,750	0,0333	0,0536
13,726		0,0421

Beispiel 2 (Vergleichsbeispiel; Messung der FDH-Langzeitaktivitäten in Gegenwart von 2',3-Dichloracetophenon als Additiv)

Die Messung der Aktivitäten der Formiatdehydrogenase erfolgte gemäß der in Vergleichsbeispiel 1 beschriebenen Durchführung, allerdings ohne Verwendung eines organischen Solvens. Dabei wurden unterschiedliche Mengen an Ketonkonzentration des 2',3-Dichloracetophenons als Additiv zugegeben. Der daraus resultierende Stabilitätsverlauf ist in Fig. 2 angegeben. Bei Verwendung von 2',3-Dichloracetophenon erfolgte eine schnelle Deaktivierung innerhalb von 5 Stunden bei Substratkonzentrationen von >10 mM.

Beispiel 3: Umsetzung mit 2-Chloracetophenon bei 250 mM

Ein Reaktionsgemisch, bestehend aus *ortho*-Chloracetophenon (2-Chloracetophenon; 250 mM), sowie NADH (0.04 Äquivalente bezogen auf das Keton), Natriumformiat (5.5 Äquivalente bezogen auf das Keton) bei Enzymmengen von 60 U/mmol einer (S)-ADH aus *R. erythropolis* (expr. in *E. coli*) und 60 U/mmol einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (Doppelmutante: C23S, C262A; expr. in *E. coli*), lässt man bei einer Reaktionstemperatur von 30°C über einen Zeitraum von 72 Stunden in 50 mL eines Phosphat-Puffers (100 mM; pH 7.0) rühren. Es werden in diesem Zeitraum Proben genommen und der jeweilige Umsatz via HPLC ermittelt. Nach 72 Stunden wurde eine vollständige Umsetzung des Ketons zum gewünschten Alkohol festgestellt. Anschließend werden die organischen Komponenten mit 2 x 50 mL Methyl-*tert*-butylether extrahiert, die wässrige Phase verworfen und die organische Phase getrocknet. Das nach Filtration resultierende Filtrat wird im Vakuum von den leichtflüchtigen Bestandteilen befreit, und der resultierende Rückstand analytisch via HPLC und ^1H -

Kernresonanzspektroskopie hinsichtlich der Bildungsrate untersucht. Es wurde eine Bildungsrate von >99% ermittelt (Fig. 3).

5 **Beispiel 4: Umsetzung mit 2-Chloracetophenon bei 400 mM**

Ein Reaktionsgemisch, bestehend aus *ortho*-Chloracetophenon (2-Chloracetophenon; 400 mM bezogen auf das Gesamtvolumen), sowie NADH (0.04 Äquivalente bezogen auf das Keton), Natriumformiat (5.5 Äquivalente bezogen auf das Keton) bei 10 Enzymmengen von 60 U/mmol einer (S)-ADH aus *R. erythropolis* (expr. in *E. coli*) und 60 U/mmol einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (Doppelmutante: C23S, C262A; expr. in *E. coli*), lässt man bei einer Reaktionstemperatur von 30°C über einen Zeitraum von 46.5 Stunden in 12 mL eines 15 Phosphat-Puffers (100 mM; pH 7.0) rühren, wobei das Gesamtvolumen 20 mL beträgt. Es werden in diesem Zeitraum Proben genommen und der jeweilige Umsatz via HPLC ermittelt. Nach 46.5 Stunden wurde via HPLC eine 20 vollständige Umsetzung des Ketons zum gewünschten Alkohol festgestellt (Fig. 4).

Beispiel 5: Umsetzung mit 4-Chloracetophenon bei 250 mM

Ein Reaktionsgemisch, bestehend aus *para*-Chloracetophenon (4-Chloracetophenon; 250 mM bezogen auf das Gesamtvolumen), 25 sowie NADH (0.04 Äquivalente bezogen auf das Keton), Natriumformiat (5.5 Äquivalente bezogen auf das Keton) bei Enzymmengen von 60 U/mmol einer (S)-ADH aus *R. erythropolis* (expr. in *E. coli*) und 60 U/mmol einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (Doppelmutante: C23S, C262A; expr. in 30 *E. coli*), lässt man bei einer Reaktionstemperatur von 30°C über einen Zeitraum von 46.5 Stunden in 15 mL eines Phosphat-Puffers (100 mM; pH 7.0) rühren, wobei das Gesamtvolumen 20 mL beträgt. Es werden in diesem Zeitraum

Proben genommen und der jeweilige Umsatz via HPLC ermittelt. Nach 46.5 Stunden wurde eine Umsetzung von >99% des Ketons zum gewünschten Alkohol festgestellt (Fig. 5).

Beispiel 6: Umsetzung mit 2',3-Dichloracetophenon bei 300 mM

Ein Reaktionsgemisch, bestehend aus *alpha,meta*-Dichloracetophenon (2',3-Dichloracetophenon; 300 mM bezogen auf das Gesamtvolumen), sowie NADH (0.04 Äquivalente bezogen auf das Keton), Natriumformiat (5.5 Äquivalente bezogen auf das Keton) bei Enzymmengen von 60 U/mmol einer (S)-ADH aus *R. erythropolis* (expr. in *E. coli*) und 60 U/mmol einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (Doppelmutante: C23S, C262A; expr. in *E. coli*), lässt man bei einer Reaktionstemperatur von 30°C über einen Zeitraum von 46.5 Stunden in 14 mL eines Phosphat-Puffers (100 mM; pH 7.0) rühren, wobei das Gesamtvolumen 20 mL beträgt. Es werden in diesem Zeitraum Proben genommen und der jeweilige Umsatz via HPLC ermittelt. Nach 46.5 Stunden wurde eine Umsetzung von >98% des Ketons zum gewünschten Alkohol festgestellt (Fig. 6).

Beispiel 7: Umsetzung mit Zimtaldehyd bei 100 mM

Ein Reaktionsgemisch, bestehend aus Zimtaldehyd (100 mM bezogen auf die eingesetzte Menge an Puffer), sowie NADH (0.2 Äquivalente bezogen auf das Keton), Natriumformiat (5.0 Äquivalente bezogen auf das Keton) bei Enzymmengen von 20 U/mmol einer (S)-ADH aus *R. erythropolis* (expr. in *E. coli*) und 20 U/mmol einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (Doppelmutante: C23S, C262A; expr. in *E. coli*), lässt man bei einer Reaktionstemperatur von 30°C über einen Zeitraum von 24.25 Stunden in 10 mL eines Phosphat-Puffers (100 mM; pH 7.0) rühren. Es werden in diesem Zeitraum Proben genommen und der jeweilige Umsatz via HPLC ermittelt. Nach 24.25 Stunden wurde eine Umsetzung von >95% des Aldehyds zum gewünschten Alkohol festgestellt (Fig. 7).

Patentansprüche:

1. Gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem aufweisend eine cofaktorabhängige enzymatische Transformation einer organischen Verbindung und eine enzymatische
5 Regeneration des Cofaktors in einem rein wässrigen Lösungsmittelsystem ohne Tensidzusatz, wobei das Substrat in einer Menge von mindestens 50 mM pro Liter Wasser in die enzymatische Transformation eingesetzt wird, sofern die Löslichkeitsgrenze des Substrats
10 nicht unterschritten wird.
2. Reaktionssystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man im Reaktionssystem zumindest anfänglich eine Emulsion oder eine Suspension vorliegen hat.
- 15 3. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Substratkonzentration zumindest anfänglich bei 50 bis 1500 mM, bevorzugt bei 100 bis 1000 mM, und ganz
20 bevorzugt bei 100 bis 500 mM liegt, pro Liter Wasser, sofern die Löslichkeitsgrenze des Substrats nicht unterschritten wird.
4. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der
25 vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man als Substrat eine Carbonylverbindung einsetzt, insbesondere einen Aldehyd oder ein unsymmetrisches Keton.
5. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der
30 vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man als Substrat eine Alkoholverbindung einsetzt,

insbesondere einen primären oder einen chiralen sekundären Alkohol.

- 5 6. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Cofaktor NADH oder NADPH eingesetzt wird.
- 10 7. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion bei Temperaturen von 10 bis 80°C, bevorzugt von 20 bis 60°C, und ganz bevorzugt von 20 bis 40°C durchgeführt wird.
- 15 8. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Enzym für die Transformation der organischen Verbindung eine Dehydrogenase eingesetzt wird.
- 20 9. Reaktionssystem nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Alkoholdehydrogenase einsetzt.
- 25 10. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Regeneration des Cofaktors durch eine Formiatdehydrogenase, insbesondere einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*, erfolgt.
- 30 11. Verfahren zur Herstellung von organischen Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche verwendet.

12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, dass
man das Reaktionsgemisch, gegebenenfalls durch Zusatz
eines organischen Solvens, in eine wässrige und eine
5 organische Phase auftrennt, und aus der organischen
Phase das gewünschte Produkt isoliert.
13. Verwendung des Reaktionssystems nach Anspruch 1 zur
enzymatischen Transformation organischer Verbindungen
oder zur Diagnose bzw. Analyse.
- 10 14. Verwendung nach Anspruch 13 in einem Verfahren zur
Herstellung enantiomer angereicherter organischer
Verbindungen.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Anmeldung richtet sich auf ein Reaktionssystem, bei dem unter Zuhilfenahme eines gekoppelten enzymatisch arbeitenden

5 Transformationsprozesses chemisch wertvolle Verbindungen in hohen Enantiomerenanreicherungen gewonnen werden können.

Das gekoppelte enzymatisches Reaktionssystem weist eine cofaktorabhängige enzymatische Transformation einer organischen Verbindung und eine enzymatische Regeneration des Cofaktors auf, wobei das Reaktionssystem mit einer

10 Menge an Substrat oberhalb dessen Löslichkeitsgrenze arbeitet.

Fig. 1:

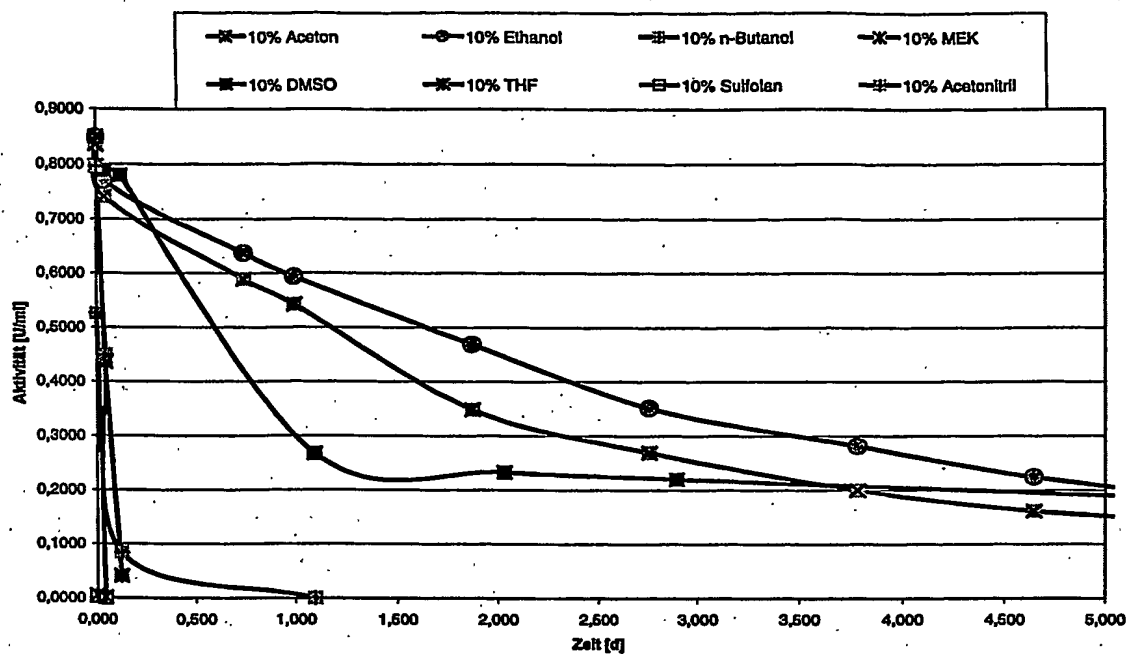


Fig. 2:

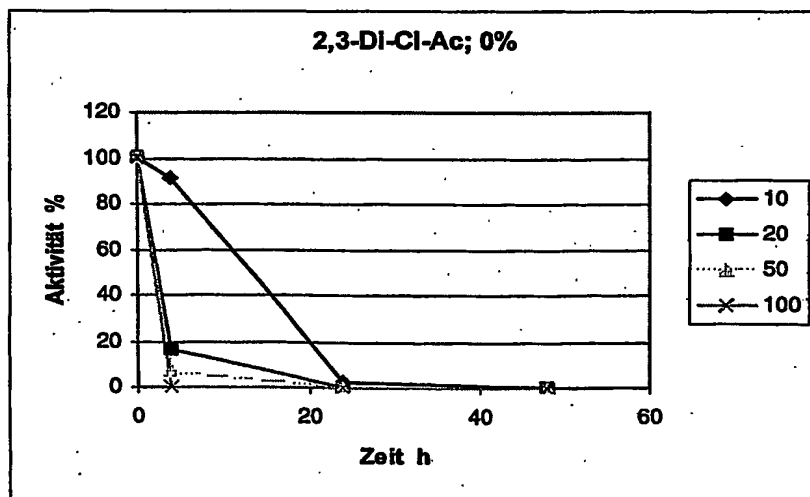


Fig. 3

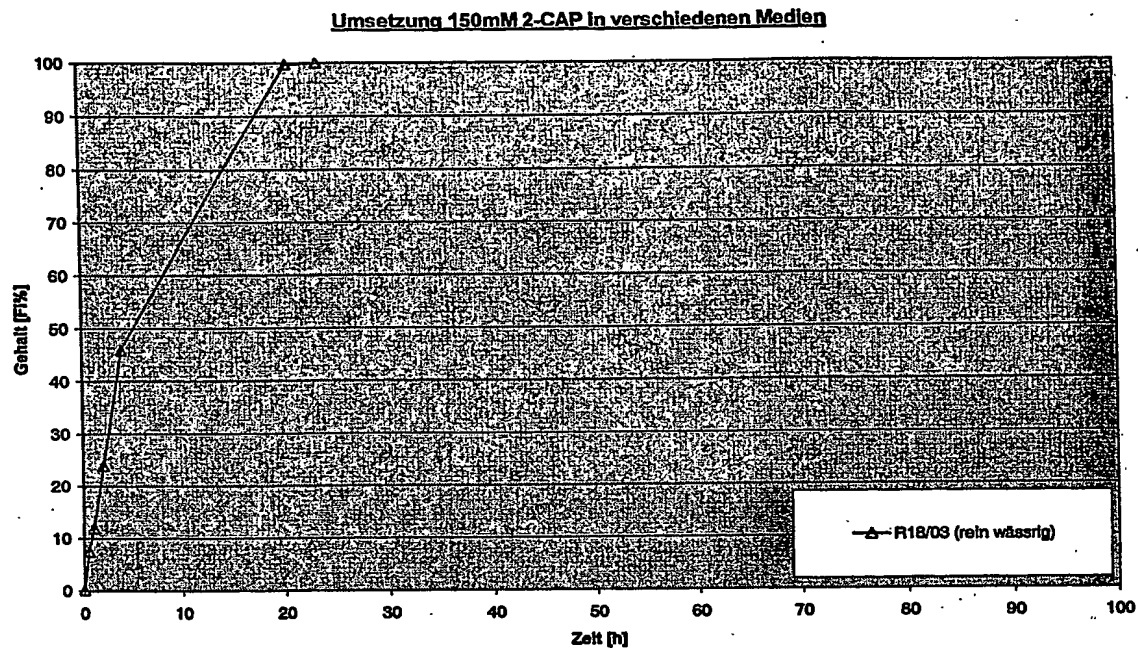


Fig. 4

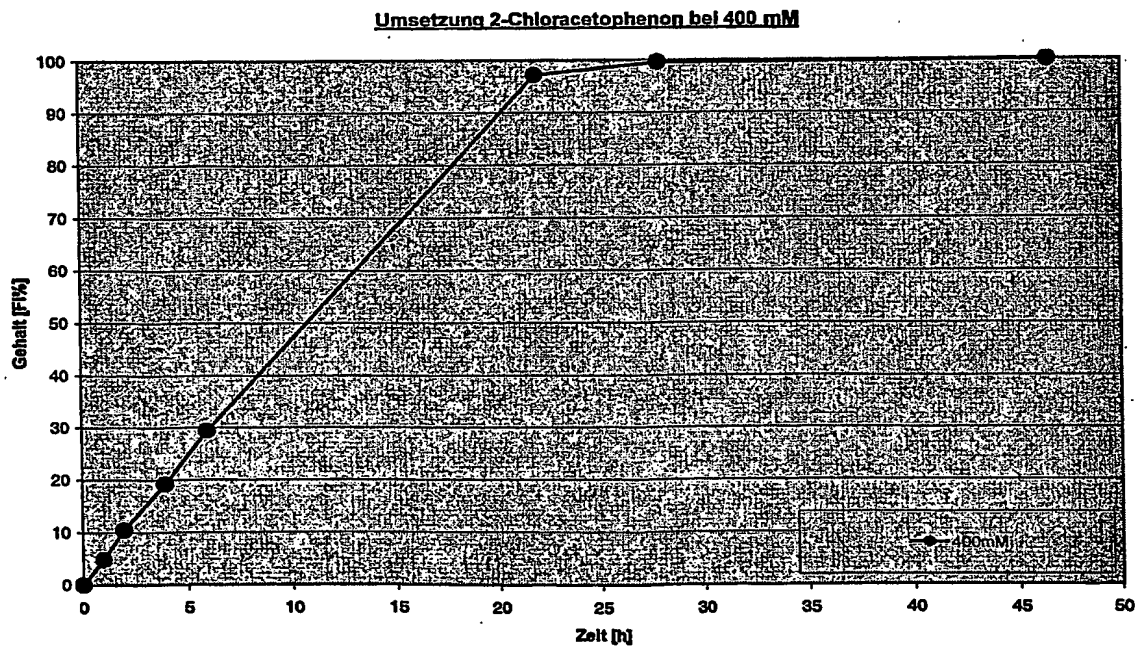


Fig. 5:

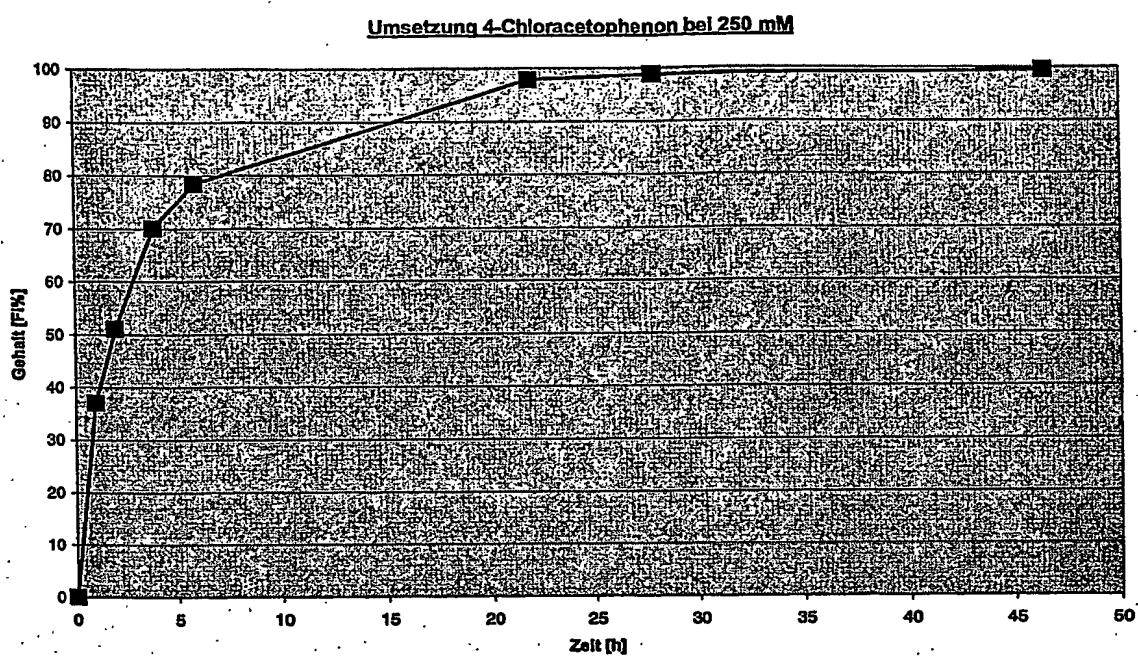


Fig. 6

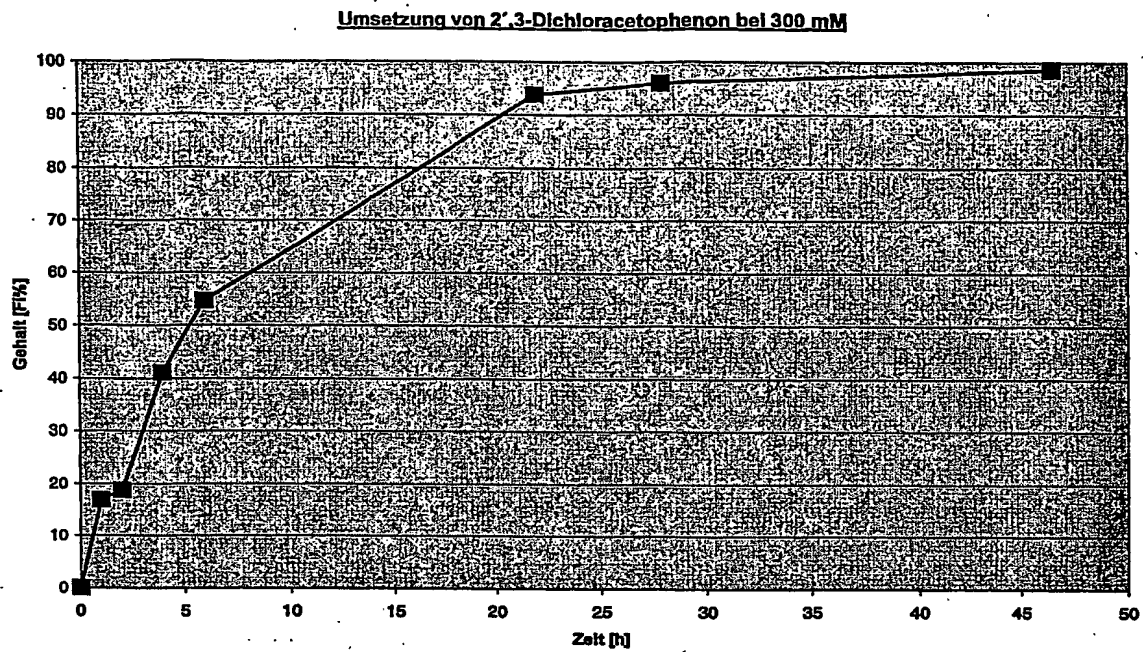
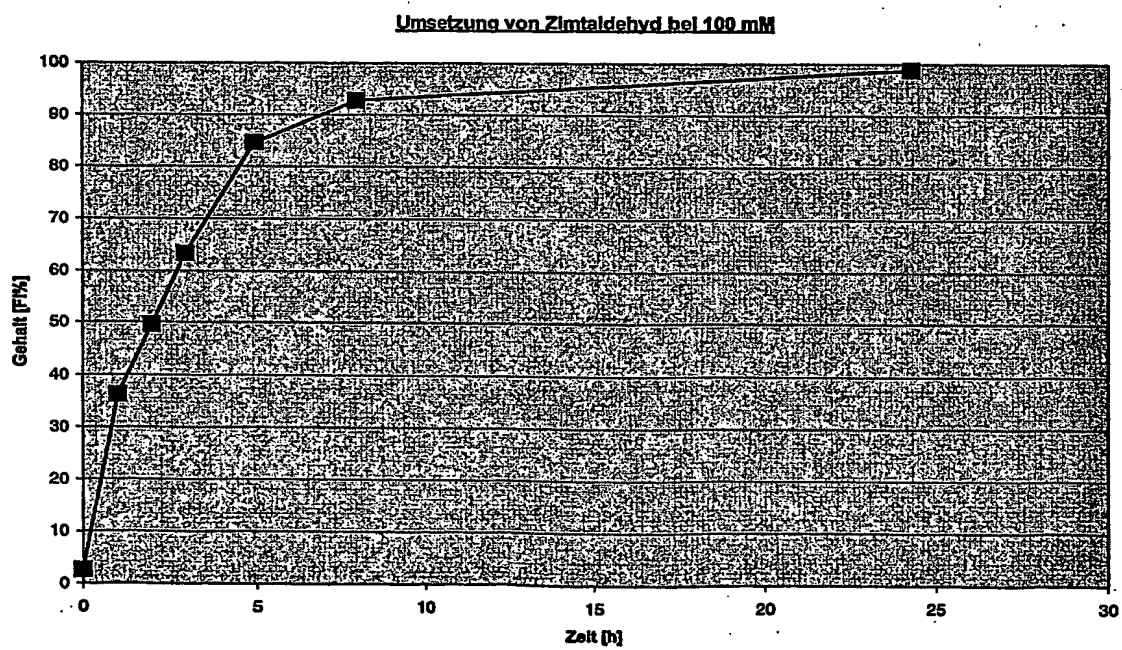


Fig. 7:



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**